

ORIGINAL | ORIGINAL

Respostas físicas, químicas e biomecânicas do osso de ratas ovariectomizadas submetidas a diversas ingestões de flúor suplementar¹

Physical, chemical and biomechanical bone response of female ovariectomized rats to various intakes of supplemental fluorine

Luiz Carlos de Paula MELLO² (*in memoriam*)

Liana Barbaresco GOMIDE³

RESUMO

Objetivo

Este estudo investiga os efeitos do flúor suplementar sobre as características dos ossos de ratas ovariectomizadas (castradas), utilizadas como modelo de osteoporose experimental, por meio da correlação entre os parâmetros biomecânicos e as propriedades físicas e químicas desses ossos.

Métodos

No início do experimento, 78 ratas *Wistar*, com quatro meses de idade, foram divididas em oito grupos: grupo basal, que gerou os parâmetros iniciais do experimento; grupo 1, formado por ratas não ovariectomizadas; e os grupos 2 a 7, constituídos por ratas ovariectomizadas submetidas a dosagens de fluoreto de sódio (NaF) de 0, 20, 40, 60, 80 e 100mg/L em solução, respectivamente, durante dois meses.

Resultados

A ovariectomia promoveu osteopenia, observada pelos parâmetros morfométricos, físicos e químicos, provocando menor resistência biomecânica dos fêmures submetidos ao ensaio de flexão. Os ossos das ratas que ingeriram 40mg de flúor demonstraram melhores características físicas, bioquímicas e biomecânicas do que os das ratas ovariectomizadas sem tratamento e os das não ovariectomizadas.

¹ Artigo elaborado a partir da tese de L.C.P. MELLO, intitulada "Influência do flúor sobre as características físicas, químicas e biomecânicas dos ossos de ratas ovariectomizadas". São Carlos, 2000. Bolsa FAPESP, processo 00/01627-7.

² Departamento de Fisiologia, Laboratório de Neuroendócrino, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP, Brasil.

³ Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Rua Pedreira de Freitas, casa 01, Campus Universitário, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: L.B. GOMIDE. E-mail: <lbgomide@yahoo.com.br>.

Conclusão

Além de promover uma proteção contra a perda óssea induzida pela deficiência de estrógenos causada pela castração, o flúor melhorou a qualidade óssea, demonstrada pelos resultados biomecânicos aumentados em relação ao grupo não ovariectomizado.

Termos de indexação: biomecânica, flúor, menopausa, osteoporose, ovariectomia.

ABSTRACT

Objective

This study investigated the effects of supplemental fluorine on the bone characteristics of ovariectomized (castrated) female rats, used as a model for experimental osteoporosis, evaluating the correlation between biomechanical parameters and the physical and chemical bone properties.

Methods

Seventy-eight female, 4-month-old Wistar rats were divided into 8 groups: the basal group, generating the initial values for the parameters; group 1, consisting of non-ovariectomized rats; and groups 2 to 7, consisting of ovariectomized rats that ingested increasing concentrations of supplemental sodium fluoride solutions (NaF): 0, 20, 40, 60, 80 and 100mg/L, respectively, for two months.

Results

Ovariectomy promoted osteopenia, determined from the morphometric, physical and chemical parameters and causing lower biomechanical resistance of the femurs submitted to flexion trials. The bones of the rats that ingested the 40mg/L fluorine solution demonstrated better physical, biochemical and biomechanical conditions than those of the non-treated ovariectomized and intact control rats.

Conclusion

Besides promoting protection against the bone loss induced by estrogen deficiency, fluorine improved bone quality, which was demonstrated by the enhanced biomechanical results as compared to the intact group.

Indexing terms: biomechanics, fluorine, menopause, osteoporosis, ovariectomy.

INTRODUÇÃO

Embora o flúor, proveniente do fluoreto de sódio, seja aparentemente benéfico para a maioria das espécies, os efeitos da suplementação merecem mais estudos. É difícil estabelecer a dosagem suplementar ideal para ingestão. Existe variação de animal para animal que pode ser influenciada por vários fatores, como quantidade total ingerida, duração da ingestão ou tempo de administração do flúor, solubilidade do flúor ingerido, idade e espécie do animal envolvido, estado nutricional geral, estresse e resposta individual¹.

Há evidências de que a dieta de humanos enriquecida com flúor diminui a desmineralização dos ossos - a osteoporose - dos indivíduos mais velhos². Trabalhos realizados por alguns pesqui-

sadores relacionam o flúor com o aumento de massa óssea³; necessitam-se, portanto, mais estudos sobre a relação desse agente terapêutico com a resistência óssea⁴.

Nesse sentido, um outro tema de especial interesse nas diversas áreas científicas é o da osteoporose, responsável por mais de 1,2 milhão de fraturas por ano nos EUA, constituindo-se a enfermidade do esqueleto de maior incidência mundial⁵. A osteoporose é definida como uma doença esquelética sistêmica, caracterizada por uma diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura com conseqüente aumento da fragilidade óssea e maior suscetibilidade às fraturas⁶. Sob condições anormais, a redução da massa óssea pode representar insuficiência de formação da matriz protéica na qual é depositado o cálcio. A formação da matriz protéica depende

de hormônios gonádicos. Quando as concentrações dos hormônios sexuais são inadequadas, o anabolismo protéico é reduzido, enquanto o catabolismo continua sem decréscimo. A maior suscetibilidade à osteoporose entre as mulheres mais idosas está associada intimamente à queda da produção de estrogênio que acompanha a menopausa⁷.

Ratas ovariectomizadas (ovx) têm sido utilizadas como modelo animal de osteoporose experimental, pois fornecem dados fundamentais semelhantes aos observados no esqueleto adulto pós-menopáusico⁸. Embora não haja um animal que atenda a todos os requisitos de modelo ideal, a rata tem sido amplamente utilizada e aprovada, pois, como a mulher após a menopausa, desenvolve osteopenia após ovariectomia.

O estudo da resistência biomecânica óssea é muito importante para a análise da qualidade de ossos suscetíveis a fraturas. O ensaio mecânico de flexão em três pontos em ossos de ratos alimentados com fluoreto de sódio demonstrou correlações lineares significativas entre os níveis de flúor e as tensões máximas medidas, indicando efeitos benéficos do flúor sobre a resistência óssea⁹.

Pelo fato de a osteoporose ser uma doença de grande interesse em saúde pública, principalmente em países como o Brasil, cuja população de idosos é crescente, a utilização do fluoreto de sódio como agente terapêutico para tratamento merece mais estudos.

Diante dessas considerações, interessou-nos: investigar a influência do flúor, proveniente do fluoreto de sódio, sobre as características ósseas de ratas ovariectomizadas, utilizadas como modelo de osteoporose experimental; verificando os efeitos químicos, físicos e a influência sobre a resistência óssea em função de diferentes dosagens.

MÉTODOS

Setenta e oito ratas *Wistar*, virgens, com quatro meses de idade no início do experimento,

provenientes do Biotério Central (Biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia) da Universidade Federal de São Carlos, foram mantidas em regimes de luz (dez horas no claro e catorze horas no escuro) e de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) controlados.

Os animais foram distribuídos em oito grupos: grupo basal (nove ratas sacrificadas com quatro meses de idade), grupo 1 (nove ratas intactas, isto é, não ovariectomizadas), grupos 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (dez ratas ovariectomizadas em cada grupo), tratadas com, respectivamente, 0, 20, 40, 60, 80 e 100mg de fluoreto de sódio (NaF) suplementar da marca Sigma por litro de água, durante dois meses, ou, aproximadamente, 0; 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 e 6mg de NaF por dia. A osteopenia se manifesta com dois meses após a ovariectomia⁸, realizada segundo técnica descrita por Zarrow et al.¹⁰ em ratas com quatro meses de idade. Os animais foram pesados semanalmente para controle do ganho de peso e tiveram livre acesso a água (média de 60mL por dia) e ração comercial da marca *Free Ribe*.

Após o sacrifício dos animais por decapitação, os fêmures e as tíbias direitos foram obtidos por meio da retirada de tecidos moles com a utilização de tesoura e bisturi. Foram separados individualmente, colocados em sacos plásticos, identificados e congelados em solução salina 0,9% a -20°C .

Os fêmures foram descongelados doze horas antes de serem submetidos aos ensaios mecânicos de flexão a três pontos. Utilizou-se uma máquina de ensaio universal *Instron 4444*, acoplada a uma célula de carga com capacidade de medir até 100kgf. A carga foi aplicada na face ântero-posterior (ou côncava) pela melhor adaptação ao suporte. Os ossos foram apoiados sobre dois suportes distanciados de 21,70mm. A força foi aplicada na porção medial óssea, a uma velocidade constante de 0,5cm/min, até o momento da ruptura do osso. A cada incremento de carga aplicada ao material foi registrada a deformação correspondente para construção do gráfico carga x deformação, por meio de um

software da máquina de ensaio. A partir desse gráfico foram calculadas as propriedades biomecânicas: carga máxima (maior carga aplicada durante o ensaio), carga de ruptura (carga obtida no momento de ruptura do osso), rigidez (inclinação da curva do gráfico carga x deformação) e resiliência (energia absorvida na fase elástica), que corresponde à área sob a curva carga x deformação.

Após o teste de flexão, os fêmures foram mantidos em água destilada e colocados no dessecador durante 24 horas para retirada do ar dos poros ósseos com auxílio de uma bomba de vácuo. Como o osso estava imerso por ocasião da retirada de ar dos poros, a água ocupou o espaço liberado. Pelo princípio de Arquimedes, obteve-se o volume do osso para cálculo da densidade óssea e densidade mineral. A cinza mineral dos ossos foi obtida após calcinação em mufla a 800°C por 24 horas, conforme estudos de Martin¹¹.

Após solubilização das cinzas dos fêmures, as concentrações de cálcio e fósforo foram determinadas por colorimetria utilizando kit comercial de marca *Labtest*.

O conteúdo de flúor foi determinado nas tíbias secas em estufa a 100°C por 24 horas. Após extração com HCl 0,5 M utilizou-se eletrodo específico *Orion* 96-09, acoplado ao analisador de íons *Orion* EA-940 do Laboratório de Bioquímica Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

Foi utilizado o teste de Tukey com procedimento *General Linear Model* (GLM) do *software Statistical Analysis Systems* (SAS)¹² para verificar se houve diferença significativa entre os tratamentos. O nível médio de significância foi estabelecido em 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi obtida uma relação linear e diretamente proporcional entre a concentração de flúor na água fornecida aos animais e a encontrada nas tíbias

das ratas, o que permite concluir que houve livre incorporação do flúor ao tecido ósseo, resultados já relatados na literatura¹³ (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações (médias \pm desvio-padrão) de flúor das tíbias direita dos animais dos diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais	Concentração final de flúor nas tíbias (mg) 2 meses		
	M	\pm	DP
Basal (inicial)	540	\pm	39
Intactas	681	\pm	55
Ovx	662	\pm	76
Ovx + 1,2mg/dia (F)	1625	\pm	249
Ovx + 2,4mg/dia (F)	2083	\pm	272
Ovx + 3,6mg/dia (F)	2008	\pm	367
Ovx + 4,8mg/dia (F)	2553	\pm	359
Ovx + 6mg/dia (F)	3395	\pm	336

Neste estudo observou-se que as ratas ovariectomizadas tiveram maior ganho de peso corporal que as não ovariectomizadas. Fato já descrito na literatura⁸, porém não foi verificada nesses grupos alteração significativa nos diâmetros da diáfise dos fêmures (Tabela 2). Resultados também demonstrados por SØgaard et al.¹⁴ e, provavelmente, esse aumento de peso se deva ao acúmulo de gordura corporal.

Em alguns grupos tratados com flúor (40 e 60mg/L de água), observou-se que o ganho de peso aumentou, e em outros grupos (20, 80 e 100mg/L de água), diminuiu em relação ao grupo 2 (ovariectomizado sem tratamento). Resultados semelhantes também foram observados na literatura¹⁵.

A média para densidade óssea do grupo não ovariectomizado foi superior à do grupo basal e à do grupo ovariectomizado sem tratamento. Os grupos tratados com flúor apresentaram médias maiores de densidade óssea quando comparados aos grupos ovariectomizado sem tratamento, não ovariectomizado e basal. Nesse caso, o flúor promoveu um aumento de massa óssea, bloqueando os efeitos da reabsorção óssea provocada pela deficiência de estrógenos, causada pela castração.

Segundo Kalu⁸, os valores de massa óssea devem ser considerados válidos quando se apresentarem menores em ratas ovariectomizadas do que em ratas do grupo basal. Os resultados de nosso estudo demonstraram redução da densidade óssea e mineral do grupo ovariectomizado sem tratamento, quando comparada com a do grupo basal e com a do grupo não ovariectomizado e, sobretudo, valores superiores para os animais ovariectomizados tratados com flúor suplementar, quando comparados com os do grupo ovariectomizado sem tratamento (Tabela 2), dados que evidenciam o efeito protetor do flúor contra a osteopenia provocada pela castração. Tais resultados se mostram coerentes com os encontrados por SØgaard et al.¹⁵, que analisaram ossos de ratas *Wistar* castradas, tratadas com água contendo várias concentrações de flúor.

O grupo ovariectomizado também apresentou valores médios menores dos teores ósseos de cálcio e fósforo em relação aos do grupo não ovariectomizado, corroborando os achados de Nordsletten et al.¹⁶. Esses resultados demonstram uma desmineralização decorrente da osteopenia, resultante da deficiência de estrógenos (Tabela 3). Os grupos tratados com flúor, comparados com os animais do grupo basal, grupo não ovariectomizado e ovariectomizado sem tratamento, na maioria dos casos apresentaram resultados superiores para o conteúdo de cálcio. Entretanto, observou-se redução não significativa dos teores de fósforo nos grupos tratados com doses suplementares de até 60mg/L, quando comparados com o grupo ovariectomizado sem tratamento e com o grupo não ovariectomizado. Beary¹⁷ comprovou melhoria na qualidade óssea de ratas *Sprague-Dawley* que receberam

Tabela 2. Propriedades físicas e morfométricas (valores médios e desvio-padrão) dos fêmures direitos dos diferentes grupos no final do experimento, exceto para o Basal.

Grupos	Ganho de peso(g)	Densidade						Diâmetro					
		Mineral (g/cm ³)						Óssea (g/cm ³)					
		M	±	DP	M	±	DP	M	±	DP	M	±	DP
Basal (inicial)	-	±	-		0,69	±	0,05	1,72	±	0,04	2,40	±	0,10
Intactas	27	±	5		0,72	±	0,07	1,79	±	0,05#	2,60	±	0,20#
Ovx	45	±	9*		0,62	±	0,08*	1,70	±	0,09*	2,70	±	0,20#
Ovx + 1,2mg/dia	48	±	17*		0,72	±	0,07+	1,82	±	0,06+#	2,80	±	0,20#
Ovx + 2,4mg/dia	37	±	7*		0,78	±	0,11+#	1,80	±	0,11+#	2,70	±	0,10#
Ovx + 3,6mg/dia	41	±	14*		0,73	±	0,15+	1,86	±	0,06+#	2,70	±	0,10#
Ovx + 4,8mg/dia	45	±	16*		0,78	±	0,09#+	1,77	±	0,07+#	2,70	±	0,30#
Ovx + 6mg/dia	48	±	13*		0,84	±	0,09#+	1,85	±	0,09+#	2,70	±	0,20#

n=9-10; p<0,05 (Teste Tukey); #vs basal; *vs intacto; + vs ovx.

Tabela 3. Valores médios e desvio-padrão dos teores ósseos de Cálcio, Fósforo e Flúor das tíbias direitas no final do experimento, exceto para o Basal.

Grupos	Cálcio (mg)			Fósforo (mg)			Flúor (mg)		
	M	±	DP	M	±	DP	M	±	DP
Basal (inicial)	205	±	5	101	±	3	540	±	39
Intactas	212	±	17	106	±	10	681	±	55#
Ovx	198	±	15*	104	±	9	662	±	76#
Ovx + 1,2mg/dia (F)	207	±	11	97	±	8	1625	±	249#*+
Ovx + 2,4mg/dia (F)	205	±	19	97	±	9	2083	±	272*+#
Ovx + 3,6mg/dia (F)	216	±	26#	101	±	10	2008	±	367#*+
Ovx + 4,8mg/dia (F)	249	±	16#*+	115	±	9	2553	±	359#*+
Ovx + 6mg/dia (F)	26	±	20#*+	119	±	8	3395	±	336#*+

n=9-10; p<0,05 (Teste Tukey); # vs basal; * vs intacto; + vs ovx.

adequação de cálcio nas dietas, quando comparada à de ratas dos grupos que receberam tratamentos com flúor sem suplementação de cálcio. Nossos resultados também confirmam essa importância do cálcio na qualidade óssea. Nesse caso, a desmineralização presente nos ossos dos animais castrados, comprovada pelos valores menores do conteúdo ósseo de cálcio e fósforo, não ocorreu nos ossos dos animais que receberam tratamento com flúor. A maior parte dos animais que recebeu flúor suplementar apresentou maiores densidades óssea e mineral, e também maiores teores de cálcio e fósforo.

A manutenção da qualidade óssea (densidade óssea e mineral) observada neste estudo, resultante do aumento do metabolismo de cálcio, também foi demonstrada por Deshmukh et al.¹⁸, que avaliaram os efeitos do fluoreto sobre o teor de cálcio nos ossos de ratos. O grupo alimentado com fluoreto apresentou teor de cálcio 15% maior que o controle. O fluoreto tem a habilidade de estimular a formação de osso por meio do aumento da atividade osteoblástica¹⁹. Alguns autores, como Kleerekoper⁴, atribuem efeitos benéficos desse agente terapêutico à atividade osteoblástica aumentada, podendo esse mineral ser utilizado como um agente anabólico anti-reabsortivo, promovendo, conseqüentemente, melhorias na mineralização e qualidade óssea.

Os efeitos danosos provocados pela castração, observados por meio de parâmetros

físicos e bioquímicos, refletiram-se sobre a biomecânica. Observou-se redução da carga máxima, rigidez, resiliência e carga de ruptura, estando de acordo com dados relatados por outros autores¹⁴.

O grupo basal apresentou valores para resiliência, rigidez, carga máxima e de ruptura inferiores ao do grupo não ovariectomizado (Tabela 4). Os efeitos da castração reduziram os valores dos parâmetros biomecânicos do grupo ovariectomizado em relação ao não ovariectomizado. Os animais tratados com flúor suplementar obtiveram melhor recuperação desses parâmetros, quando comparada à dos animais do grupo ovariectomizado sem tratamento. Resultados menores para carga máxima, carga de ruptura, resiliência e rigidez também foram observados neste estudo para o grupo ovariectomizado, quando comparados com os do não ovariectomizado.

Realizando ensaio mecânico de flexão a três pontos em ossos de ratos alimentados com fluoreto de sódio, Nakahara⁹ demonstrou relações significativas entre os níveis de flúor e as tensões máximas medidas, indicando efeitos benéficos do flúor sobre a resistência óssea. Nossos resultados também mostram melhorias das propriedades mecânicas dos ossos dos animais tratados com flúor, quando comparados com os do grupo ovariectomizado sem tratamento. Os grupos tratados com flúor apresentaram maiores densidades minerais, e, conseqüentemente, maiores

Tabela 4. Valores médios e desvio-padrão das propriedades biomecânicas obtidas nos ensaios de flexão a três pontos dos fêmures no final do experimento, exceto para o Basal.

Grupos	Carga máxima (n)			Carga de ruptura (n)			Resiliência (x10 ⁻³ J)			Rigidez (x10 ³ n/m)		
	M	±	DP	M	±	DP	M	±	DP	M	±	DP
Basal (inicial)	76	±	5	81	±	6	16	±	1	141	±	15
Intactas	105	±	8 #	89	±	8#	16	±	2	150	±	19#
Ovx	79	±	6 *	76	±	4#*	16	±	3	142	±	13
Ovx + 1,2mg/dia	89	±	12#+	89	±	8#+	22	±	6#+*	134	±	19*
Ovx + 2,4mg/dia	118	±	7 *+ #	91	±	9#+	23	±	3# *+	204	±	30#*+
Ovx + 3,6mg/dia	118	±	9#+	98	±	9#+	22	±	2#+*	198	±	32#*+
Ovx + 4,8mg/dia	104	±	8 #+	86	±	5+	17	±	2	203	±	31#*+
Ovx + 6mg/dia	98	±	11 #+	79	±	6	16	±	4*	190	±	35#*+

n=9-10; p<0,05 (Teste Tukey); #vs basal; *vs intacto; + vs ovx.

valores biomecânicos, quando comparados com o grupo ovariectomizado sem tratamento.

Em ossos de ratos alimentados com dietas deficientes em cálcio e fósforo foram encontrados valores menores para carga máxima, tensão máxima e carga no limite elástico²⁰, concordando com os resultados encontrados neste estudo em que houve diminuição do cálcio e do fósforo nos grupos ovariectomizados observado pelos parâmetros biomecânicos. Verificaram-se, neste experimento, valores maiores para carga máxima, carga de ruptura, resiliência e rigidez para a maioria dos grupos tratados com flúor, que apresentavam maiores teores de cálcio nos fêmures. Nesse caso, a osteopenia induzida pela castração causou desmineralização óssea provocando diminuição dos parâmetros biomecânicos. Entretanto, o efeito protetor do flúor contra a osteopenia pode ser verificado nos resultados biomecânicos obtidos.

A ingestão de grandes quantidades de flúor pode causar lesões nos osteócitos e osteoblastos, prejudicando a mineralização óssea e causando diminuição da resistência²¹. Nosso estudo demonstrou que a suplementação com flúor a 40mg/L de água apresentou os melhores resultados, pois, além de promover uma proteção contra a perda óssea induzida pela deficiência de estrógenos causada pela castração, melhorou a qualidade óssea, demonstrada pelos resultados biomecânicos aumentados em relação ao grupo não ovariectomizado.

Dosagens altas de flúor podem causar efeitos adversos significativos, como irritação gastrointestinal, tendinites e dores das articulações em humanos. Os efeitos de fluoretos sobre o esqueleto podem ser benéficos quando estabelecidas dosagens limitadas, ou prejudiciais, quando em grandes concentrações⁴.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, verifica-se que os ossos das ratas que ingeriram

flúor suplementar a 40mg/L de água, durante dois meses, demonstraram melhores condições físicas, bioquímicas e biomecânicas do que os ossos dos animais ovariectomizados sem tratamento e dos animais não ovariectomizados. Além de promover uma proteção contra a perda óssea, induzida pela deficiência de estrógenos causada pela castração, essa suplementação de flúor melhorou a qualidade óssea desse grupo, demonstrada pelos resultados biomecânicos aumentados em relação ao grupo não ovariectomizado.

REFERÊNCIAS

1. National Academy of Sciences. Committee on Animal Nutrition. Mineral tolerance of domestic animals. Washington (DC): National Academy of Sciences; 1980.
2. McDowell LR. Fluorine. Minerals in animal and human nutrition. London: Academic Press; 1992.
3. National Research Council. Committee on Animal Nutrition. Subcommittee on Fluorosis. Effects of fluorides in animals. Washington (DC): National Research Council; 1974.
4. Kleerekoper M. Fluoride and the skeleton. Crit Rev Clin Lab Sci. 1996; 33(2):139-61.
5. Queiroz MV. Prevenção de osteoporose. Rev Bras Reumatol. 1994; 34(5):253-60.
6. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltav N. The diagnosis of osteoporosis. J Bone Miner Res. 1994; 9(8):1137-41.
7. Turek SL, editor. Ortopedia: princípios e sua aplicação. 4.ed. São Paulo: Manole; 1991.
8. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner. 1991; 15(3):175-91.
9. Nakahara H. The effect of sodium fluoride on bone mineral density and bone strength in ovariectomized rats. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi. 1995; 69(11):1182-92.
10. Zarrow MX, Yochim JM, McCarthy JL, Sanborn RC. Experimental endocrinology: a sourcebook of basic techniques. New York: Academic Press; 1964. p.39-40.
11. Martin RB. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. J Biomech. 1990; 23(10):1021-9.
12. Statistical Analysis Systems. Statistical analysis systems user's guide. 4th ed. Cary: SAS Institute; 1990.

13. Navia JM, Lopez H, Bradley EL. Biological rat assay for total fluoride availability in foods. *J Nutr.* 1981; 111(4):755-61.
 14. SØgaard CH, Mosekilde L, Thomsen JS, Richards A, Mcosker JE. A comparison of the effects of two anabolic agents (Fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in na osteopenic rat model. *Bone.* 1997; 20(5):439-49.
 15. SØgaard CH, Mosekilde L, Schwartz G, Leidig G, Minne HW, Ziegler R. Effects of fluoride on rat vertebral body biomechanical competence and bone mass. *Bone.* 1995; 16(1):163-9.
 16. Nordsletten L, Kaastad TS, Madsen JE, Reikeras O, Øvstebø R, Strømme JH, et al. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. *Calcif Tissue Int.* 1994; 55(6):436-42.
 17. Beary DF. The effects of fluoride and low calcium on the physical properties of the rat femur. *Anat Rec.* 1969; 164(3):305-16.
 18. Deshmukh DS, Méranger JC, Shah BG. The effect of dietary fluoride on calcium and phosphorus metabolism of rats. *Can J Physical Pharmacol.* 1970; 48(8):503-9.
 19. Rich C, Ensinn J. Effect of sodium fluoride on calcium metabolism of human beings. *Nature.* 1961; 191:184-5.
 20. Guggenheim K, Simkin A, Wolinsky I. The effect of fluoride on bone of rats fed diets deficient in calcium or phosphorus. *Calcif Tissue Int.* 1976; 24(6):9-17.
 21. Suttie JW. Nutritional aspects of fluoride toxicosis. *J Anim Sci.* 1980; 51(3):759-66.
- Recebido para publicação em 19 de setembro de 2003 e
aceito em 6 de agosto de 2004.